

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-286087

(43)Date of publication of application : 27.10.1998

(51)Int.Cl.

C12N 11/08
 C12P 7/46
 C12P 13/20
 //(C12P 7/46
 C12R 1:38)
 (C12P 7/46
 C12R 1:19)
 (C12P 7/46
 C12R 1:07)
 (C12P 7/46
 C12R 1:01)
 (C12P 13/20
 C12R 1:19)
 (C12P 13/20
 C12R 1:13)
 (C12P 13/20
 C12R 1:06)

(21)Application number : 10-015809

(71)Applicant : NIPPON SHOKUBAI CO LTD

(22)Date of filing : 28.01.1998

(72)Inventor : KOMATSUZAKI TOSHIMI
 MUKOYAMA MASAHARU
 SAKANO KOICHI

(30)Priority

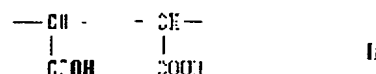
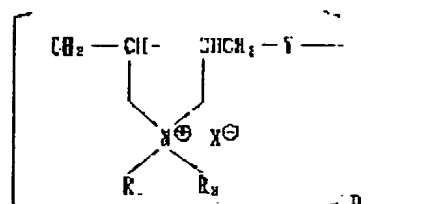
Priority number : 09 30647 Priority date : 14.02.1997 Priority country : JP

(54) IMMOBILIZED BIOLOGICAL CATALYST

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an immobilized biological catalyst minimized in the deactivation of an enzyme, excellent in safety, and useful for the production of L-aspartic acid, fumaric acid, etc., by immobilizing cells containing the enzyme on a water-insoluble solid carrier with a specific polymer.

SOLUTION: This immobilized biological catalyst is obtained by immobilizing cells containing an enzyme, such as bacterial cells containing aspartase and/or maleic acid isomerase, on a water-insoluble carrier such as a granular or sheet-like ion exchange resin or a granular or sheet-like inorganic carrier. Fumaric acid and ammonia or ammonium fumarate, or maleic acid and ammonia or ammonium maleate are preferably reacted with each other on the immobilized biological catalyst to produce L-aspartic acid or fumaric acid.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-286087

(43) 公開日 平成10年(1998)10月27日

(51) Int.Cl.⁶ 識別記号

C 1 2 N 11/08

C 1 2 P 7/46

13/20

// (C 1 2 P 7/46

C 1 2 R 1:38)

F I

C 1 2 N 11/08

C 1 2 P 7/46

13/20

A

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-15809

(22) 出願日 平成10年(1998)1月28日

(31) 優先権主張番号 特願平9-30647

(32) 優先日 平9(1997)2月14日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000004628

株式会社日本触媒

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

(72) 発明者 小松崎 聡美

茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株

式会社日本触媒内

(72) 発明者 向山 正治

茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株

式会社日本触媒内

(72) 発明者 阪野 公一

茨城県つくば市観音台1丁目25番地12 株

式会社日本触媒内

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54) 【発明の名称】 固定化生体触媒

(57) 【要約】

【課題】 新規な固定化生体触媒とその利用方法の提供。

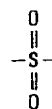
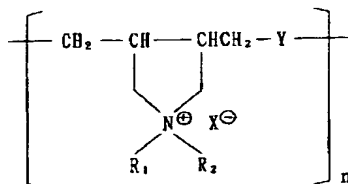
【解決手段】 下記一般式 (I) (式中、Yは直接結合であるか又は下記式 (II) により表わされる2価基であり、R₁ 及び R₂ は相互に独立に水素原子又は有機基であり、

【化1】

X[⊖]

は陰イオンであり、そしてnは100~5000の数である) により表わされるポリマーにより、酵素を含有する細胞を固定化して成る固定化生体触媒。

【化2】



又は

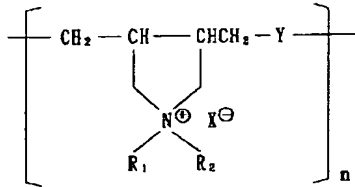


【効果】 1週間以上連続使用しても活性が実質上低下しない。

【特許請求の範囲】

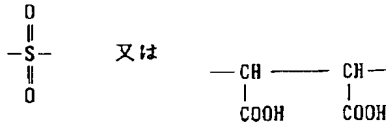
【請求項 1】 水不溶性固体担体上に、次の一般式：

【化 1】



(式中、Yは直接結合であるか、又は次の式：

【化 2】



により表わされる 2 価基であり、R₁ 及び R₂ は相互に独立に水素原子又は有機残基であり、

【化 3】



は陰イオンを表わし、そして n は 100～5000 の数である) により表わされるポリマーにより、酵素を含有する細胞を固定して成る固定化生体触媒。

【請求項 2】 前記担体がイオン交換樹脂又は無機担体である、請求項 1 又は 2 に記載の固定化生体触媒。

【請求項 3】 前記担体が粒状物、又はシートである、請求項 1～2 のいずれか 1 項に記載の固定化生体触媒。

【請求項 4】 前記細胞が、アスパルターゼおよび／またはマレイン酸イソメラーゼを含有する細菌細胞、並びに該細菌細胞の組合せである請求項 1～3 のいずれか 1

項に記載の固定化生体触媒。

【請求項 5】 フマル酸とアンモニアもしくはフマル酸アンモニウム、又はマレイン酸とアンモニアもしくはマレイン酸アンモニウムあるいはマレイン酸を請求項 4 に記載の固定化生体触媒上で反応せしめることを特徴とする L-アスパラギン酸あるいはフマル酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規固定化生体触媒及びその使用に関する。

【0002】

【従来の技術】固定化生体触媒としては、固体担体の表面に物理的吸着、イオン結合又は共有結合により酵素又は微生物を結合したもの、菌体等の酵素含有物を相互に架橋したもの、酵素や酵素含有物を格子やマイクロカプセルに包括したもの、等が知られている。また、これらとは異なるタイプの固定化触媒として、特開平 5-344898 号公報には、固体担体表面上でポリアゼチジンプレポリマー、カルボキシメチルセルロース、ポリウレタンヒドロゲルプレポリマー又はポリメチレンイソシアネ

ートを硬化せしめることにより微生物細胞を該固体表面上に固定する方法が記載されている。しかしながら、この方法においては固定化時における酵素の失活が大きいなどの問題点がある。

【0003】

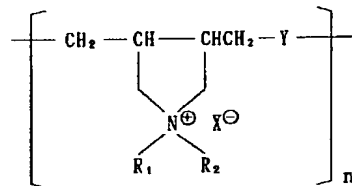
【発明が解決しようとする課題】従って本発明は、上記の欠点を解消した新規な固定化生体触媒を提供しようとするものである。

【0004】

10 【課題を解決するための手段】本発明者らは上記の特許を解決すべき種々検討した結果、酸性において水溶性でありアルカリ性において不溶性となるポリアリルアミン系ポリマーにより酵素含有細胞を固体担体に結合させることにより、上記の欠点を有さず、且つ酵素活性を長時間にわたって安定に維持することができる固定化生体触媒が得られることを見出し、本発明を完成した。従って本発明は、水不溶性固体担体上に、次の一般式：

【0005】

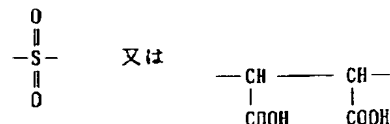
【化 4】



(式中、Yは直接結合であるか、又は次の式：

【0006】

【化 5】



により表わされる 2 価基であり、R₁ 及び R₂ は相互に独立に水素原子又は有機残基であり、

【0007】

【化 6】



は陰イオンであり、そして n は 100～5000 の数である) により表わされるポリマーにより、酵素を含有する細胞を固定化して成る固定化生体触媒を提供する。

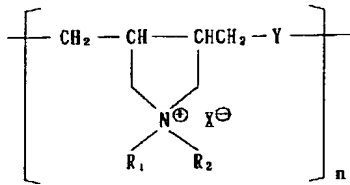
【0008】本発明はまた、上記の細胞としてアスパルターゼもしくはアスパルターゼとマレイン酸イソメラーゼの両者を含有する細胞、あるいはアスパルターゼを含有する細胞とマレイン酸イソメラーゼを含有する細胞との組合せを用いる固定化生体触媒に、フマル酸とアンモニアもしくはフマル酸アンモニウム又はマレイン酸とアンモニアもしくはマレイン酸アンモニウムを接触せしめることを特徴とする、L-アスパラギン酸の製造方法を提供する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の固定化生体触媒において使用する担体としては、粒状物又はシート状物のいずれでもよく、例えば、粒状物としてはイオン交換樹脂、例えばアニオン交換樹脂である（オルガノ（株）製）アンバーライトIRA-904、IRA-94S、アンバーリストA-26、A-27、カチオン交換樹脂である（オルガノ（株）製）アンバーライト200C、201B、IRC-50、IRC-76等が使用される；無機担体、例えばモレキュラーシーブ、アルミナ、シリカ、シリカゲル等が使用される。粒状物の粒径は、0.1mm～1.0mmが好ましく、さらに好ましくは0.3mm～3mmである。またシート状物としてはイオン交換膜やアルミナやシリカのシート等が使用される。シート状物の厚さは、0.01mm～1.0mmが好ましくさらに好ましくは0.1mm～5mmである。本発明において細胞を固定化するために使用する樹脂としては、次の一般式：

【0010】

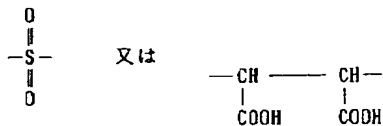
【化7】



（式中、Yは直接結合であるか、又は次の式：

【0011】

【化8】



により表わされる2価基であり、R₁及びR₂は相互に独立に水素又は有機残基であり、

【0012】

【化9】

X[⊖]

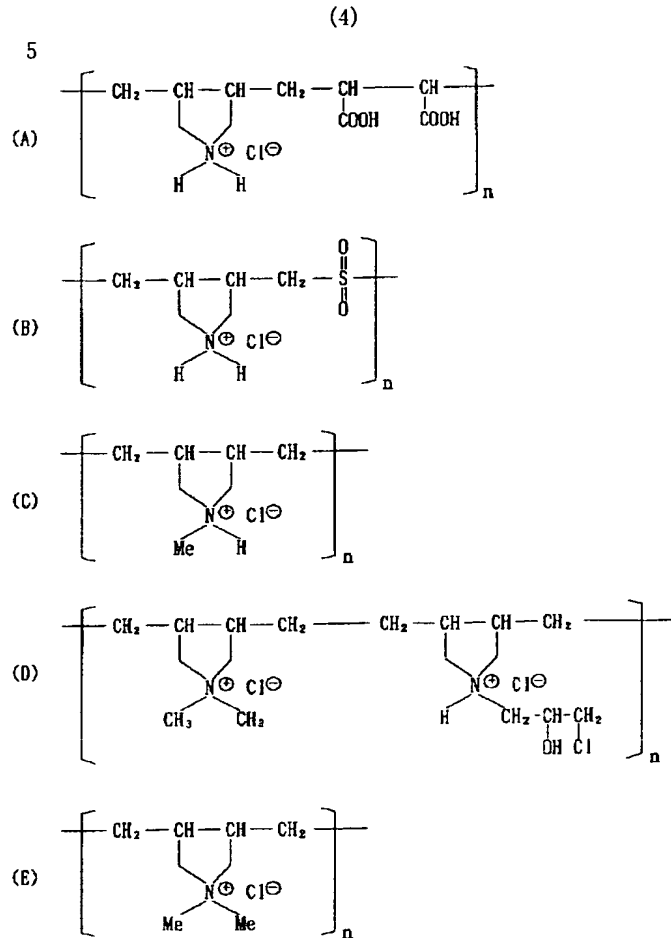
は陰イオンを表わし、そしてnは100～5000の数である）により表わされるポリマーが使用される。

【0013】式中、R₁及びR₂の有機残基としては、炭素数10個以下のアルキル基が挙げられ、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基等であり、メチル基が特に好ましい。さらに、ハロゲンやヒドロキシルの置換した有機残基を使用することができ4-クロロ-2-ジメチルペンチル基、3-エチル-2,5-ジクロロヘプチル基、2-ヒドロキシ-3,5-ジメチルノニル基などであり、特に、3-クロロ-2-ヒドロキシプロピル基が好ましい。

【0014】X[⊖]としてはハロゲンイオン、例えばF[⊖]、Cl[⊖]、Br[⊖]、I[⊖]が挙げられ特にCl[⊖]が好ましい。さらに、他の一価の陰イオン、例えばNO₃[⊖]などを使用することもできる。nは好ましくは100～5000である。具体的なポリマーとしては、次の構造式により示されるものが挙げられる。

【0015】

【化10】



【0016】式 (A) のポリマーは、例えば商品名 PAS410 として、式 (B) のポリマーは例えば商品名 PAS92 として、式 (C) のポリマーは例えば商品名 PAS-M-1 として、式 (D) のポリマーは例えば商品名 PAS-880 として、式 (E) のポリマーは例えば商品名 PAS-H-5L として、日東紡績株式会社から入手することができる。また、例えば式 (A) のポリマーは、ジアリルアミン塩（例えば塩酸塩）とマレイン酸の 1 : 1 共重合により製造することができ、式 (B) のポリマーはジアリルアミン塩（例えば塩酸塩）と亜硫酸ガスとの共重合又はラジカル重合により、式 (C) のポリマーはジアリルモノアルキルアミンの共重合又はラジカル重合により、製造することができる。

【0017】本発明で使用する細胞としては、所望の酵素を含有する任意の細胞を使用することができ、例えば

細菌、酵母、藻類、糸状菌等の微生物細胞、植物細胞等が使用できる。酵素としては、特に限定されないが、例えばフマル酸アンモニウムを L-アスパラギン酸に転換するアスパルターゼ、マレイン酸をフマル酸に転換するマレイン酸イソメラーゼ、フマル酸を L-リンゴ酸に転換するフマルーゼ、マレイン酸を D-リンゴ酸に転換するマレアーゼ、シスエポキシコハク酸を L-酒石酸に転換するヒドラターゼ等、種々の酵素が挙げられる。より具体的な細胞の例として、アスパルターゼを含有する細菌細胞、マレイン酸イソメラーゼを含有する細菌細胞、アスパルターゼとマレイン酸イソメラーゼの両方を含有する細菌細胞等が使用される。さらに、具体的には、例えば次のような微生物の細胞を使用することができる。

【0018】

【表 1】

表 1

固定化生体触媒を用いた反応の種類

原 料	生 成 物	酵 素	細 胞
フマル酸 アンモニウム	L-アスパラ ギン酸	アスパルター ゼ	エッシャーシア コリ (Escherichia coli) ATCC 11303 " " ATCC 9537 " " ATCC 27325 ブレヴィバクテリウム (Brevibacterium) 属
マレイン酸	フマル酸	マレイン酸 イソメラーゼ	シュードモナス (Pseudomonas) 属 シュードモナス マルトフィリア (Pseudomonas maltophilia) ATCC 13270
マレイン酸 アンモニウム	L-アスパラ ギン酸	マレイン酸 イソメラーゼ +アスパル ターゼ	アルカリゲネス (Alcaligenes) 属 アルカリゲネス フェーカリス (Alcaligenes faecalis) ATCC 8750 マレイン酸イソメラーゼ活性を有する微生物およびアスパ ルターゼ活性を有する微生物を組み合わせたものも可能。
フマル酸	L-リンゴ酸	フマラーゼ	アスパルターゼ活性を有する微生物 エッシャーシア コリ (Escherichia coli) IFO 3301 バチルス ステアロサーモフィルス (Bacillus stearothermophilus) DSM 2234 スルフォロボス ソルフアタリカス (Sulfolobus solfataricus) ATCC 49255
マレイン酸	D-リンゴ酸	マレアーゼ	シュードモナス シュードアルカリゲネス (Pseudomonas Pseudoalcaligenes) NSM-5 NSM-6 工業技術院 生工研 寄託番号 PBRM P-15561 P-15562
シスエポキ シコハク酸	L-酒石酸	ヒドラターゼ	アシネトバクター タルタロゲネス (Acinetobacter tartarogenes) ATCC 31105

【0019】これら微生物の細胞を培養した培養液に先の一般式(化4)で示されるポリマーを低濃度で添加すると、培養菌体を凝縮沈降させることができ、大量の培養液を遠心分離にかけの必要がなくなるため操作が簡易となる。具体的には、固定化する微生物を培養した培養液に、先の一般式(化4)で示されるポリマーを固型分濃度として10～10000ppmになるように、好ましくは100～1000ppmになるように添加し、静置すると微生物菌体が凝集し、沈降する。この時、あらかじめ培養液を冷却しておけば、目的の酵素活性の低下を防ぐのに有効である。

【0020】このようにして、微生物菌体を沈降させた後、上澄みを抜き出すことによって液量を数分の1に減らすことが出来る。例えば、1Lの培養液にPAS-880を500ppm添加して、30分静置すると、約800mlが上澄みとして分離される。残りの菌体凝集液を3000rpmの低速遠心分離器にかけると、菌体をケーキとして回収することが出来る。このように凝集した菌体は低速遠心機でも十分に遠心分離できるため、簡易な装置で菌体が回収出来るようになる。回収した菌体はそのまま、あるいは水を追加して、pH調節したポリマーと混合することによって固定化の材料として使用することが出来る。

【0021】細胞の固定に当っては1種類の細胞を固定することもでき、又は複数種類の細胞を固定することもできる。例えば、マレイン酸イソメラーゼを含有する細菌細胞とアスパルターゼを含有する細菌細胞とを組合せて固定することができる。細胞の固定にあたっては、弱酸性にした液状のポリマーに細胞を水と共に混合した

後、この混合物pHを中性～塩基性にし、固体担体にまぶして乾燥すればよい。乾燥はロータリーエバポレータ、流動床乾燥器、スプレッドライヤー等、細胞中の酵素が不活性化しない程度で操作できる常用の粒体乾燥機を用いることができる。

【0022】1回の操作により固定化される細胞の量が少ない場合には、固体担体にポリマー/細胞混合物をまぶす操作と乾燥操作を複数回、例えば2～5回反復することもできる。固定化すべき細胞とポリマーとの比率は細胞(乾物重量として)1kgに対してポリマー4kg～200kg、好ましくは10kg～50kgである。ポリマーと細胞との混合物を調製する場合に添加する水の量は細胞1kg当り5kg～400kg、好ましくは20kg～100kgである。固定化した後の細胞を含むポリマー層の厚さは0.01～0.3mm、好ましくは0.1～0.2mmである。

【0023】固定化触媒を膜状にする場合は、前記のごときシート状担体に、上記の細胞/ポリマー混合物を塗布した後乾燥すればよい。固定化された細胞の密度は、塗布量、又は塗布-乾燥の反復回数の調整により調節することができる。本発明の固定化生体触媒の応用例の1つとしてL-アスパラギン酸の生産がある。この場合、アスパルターゼを有する細胞、特に細菌細胞を固定化した固定化生体触媒をカラムに詰め、これにフマル酸とアンモニアとの水溶液、又はフマル酸アンモニウムの水溶液を通過させればよい。

【0024】また、アスパルターゼとマレイン酸イソメラーゼとを有する細胞(例えば細菌細胞)を固定化した固定化生体触媒、又はアスパルターゼを有する細胞とマ

30

40

50

レイン酸イソメラーゼを有する細胞の両者を1つの固定化担体に固定化した固定化生体触媒をカラムに詰め、これにマレイン酸とアンモニアとの水溶液又はマレイン酸アンモニウム水溶液を通過させることによりマレイン酸から1段階の操作でL-アスパラギン酸を生成せしめることができる。

【0025】また、マレイン酸イソメラーゼを有する細胞を固定化した固定化生体触媒と、アスパルターゼを有する細胞を固定化した固定化生体触媒の両者を混合しカラムに詰め、これにマレイン酸とアンモニアとの水溶液、又はマレイン酸アンモニウム水溶液を通過させることによりマレイン酸から1段階の操作でL-アスパラギン酸を生成せしめることができる。

【0026】さらに、マレイン酸イソメラーゼを有する細胞を固定化した固定化生体触媒と、アスパルターゼを有する細胞を固定化した固定化生体触媒とを別々のカラムに詰め、マレイン酸とアンモニアの水溶液、又はマレイン酸アンモニウム水溶液を、まずマレイン酸イソメラーゼを固定化した固定化生体触媒を通してマレイン酸をフマル酸に転換した後、アスパルターゼを固定化した固定化生体触媒のカラムを通してフマル酸アンモニウムをL-アスパラギン酸に転換することができる。

【0027】

【実施例】以下に本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、反応生成物は、液体クロマトグラフィーにより分析した。

実施例1. 蒸留水1Lあたり10gのフマル酸、5gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1gの KH_2PO_4 、3gの K_2HPO_4 、0.5gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5.5gの NaOH 及び20gの酵母エキスの組成からなる培地(pH6.3)3Lを5Lジャーファーメンターに仕込み、エッシャーリア・コリ(Escherichia coli) ATCC11303株を接種し、37℃で通気攪拌培養を行った。培養20時間目に培養を終了し、菌体を遠心分離によって集めた。

【0028】PAS-880(日東紡績株式会社製)をアルカリでpHを7付近にしたもの70g及び脱イオン水230gをよく混合し、前記の菌体を均一に分散させた。6L容のナス型フラスコにイオン交換樹脂(アンバーライトIRA-94S C1型オルガノ社製、平均粒径0.5mm)300mlと0.5インチのテフロン球200個を入れ、ここに先に得た菌体分散液の1/6を入れ、30℃で回転させながらエバポレーターで1時間減圧乾燥し、菌体をイオン交換樹脂に被覆させた。この操作を6回行った後、テフロン球を除去してビーズ状の固定化生体触媒を得た。

【0029】前記において調製した固定化生体触媒を、20%フマル酸アンモニウム溶液(pH8.5)に4℃で一晩浸したのち、その50mlをジャケット付きカラムに充填し、ジャケットに30℃の温水を循環させて、反応

器の温度を30℃に設定した。ふた付きビンに入れた基質液(1L中に200gのフマル酸、200gの25%アンモニア水、0.25gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及び1gの亜硫酸ナトリウム、アンモニアでpH8.3に調製)をテフロンチューブを通して、毎時25mlの速度でカラムに流通させ連続反応を行った。

【0030】反応開始後6時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費フマル酸とほぼ等モルのL-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は99.7%であった。また、反応開始後7日目、1ヶ月目及び4ヶ月目の変換率も99.7%を維持していた。なお、固定化生体触媒の形状にも変化はなかった。

【0031】**実施例2~4.** 実施例1と同様に操作したが、固定化用ポリマーとしてPAS-880の代りに、PAS-M-1(実施例2)、PAS-410(実施例3)及びPAS-H-5L(実施例4)、を用いた。これらの結果をまとめて表2に示す。

【0032】

【表2】

表 2

	ポリマー	初期変換率(%)	7日後の変換率(%)
実施例1.	PAS-880	99.7	99.7
2.	PAS-M-1	99.8	99.7
3.	PAS-410	99.8	99.7
4.	PAS-H-5L	99.6	99.6

7日間使用した後も、フマル酸からL-アスパラギン酸への変換率は低下しなかった。

【0033】**実施例5.** 実施例1と同様にエッシャーリアコリ(Escherichia coli) ATCC11303株を培養し、37℃で通気攪拌培養を行った。培養20時間目に培地を10℃に冷却し、PAS-880 3gを添加して5分攪拌後、攪拌を止めて静置した。30分後、菌体が凝集して沈降したので、上澄み液約2.5Lを抜き出した。残りの液を菌体とともに抜き出し、低速遠心分離機によって湿菌体120gを回収した。PAS-880(日東紡績株式会社製)をアルカリでpH7付近にしたもの70g及び脱イオン水170gをよく混合し、前記の菌体を均一に分散させた。6L容のナス型フラスコにイオン交換樹脂(アンバーライトIRA-94S C1型オルガノ社製、平均粒径0.5mm)300mlと0.5インチのテフロン球200個を入れ、ここに先に得た菌体分散液の1/6を入れ、30℃で回転させながらエバポレーターで1時間減圧乾燥し、菌体をイオン交換樹脂に被覆させた。この操作を6回行った後、テフロン球を除去してビーズ状の固定化生体触媒を得た。

【0034】前記において調製した固定化生体触媒を、20%フマル酸アンモニウム溶液(pH8.5)に4℃で

一晚浸したのち、その50mlをジャケット付きカラムに充填し、ジャケットに30℃の温水を循環させて、反応器の温度を30℃に設定した。ふた付きビンに入れた基質液（1L中に200gのフマル酸、200gの25%アンモニア水、0.25gの $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 及び1gの亜硫酸ナトリウム、アンモニアでpH8.3に調製）をテフロンチューブを通して、毎時25mlの速度で*

*カラムに流通させ連続反応を行った。

【0035】反応開始後6時間目に反応液の分析を行ったところ、反応生成物として、消費フマル酸とほぼ等モルのL-アスパラギン酸が生成し、その反応変換率は99.7%であった。また、反応開始後7日目、1ヶ月目及び4ヶ月目の変換率も99.7%を維持していた。なお、固定化生体触媒の形状にも変化はなかった。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

(C 1 2 P 7/46
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 7/46
C 1 2 R 1:07)
(C 1 2 P 7/46
C 1 2 R 1:01)
(C 1 2 P 13/20
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 13/20
C 1 2 R 1:13)
(C 1 2 P 13/20
C 1 2 R 1:06)